

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005年10月13日 (13.10.2005)

PCT

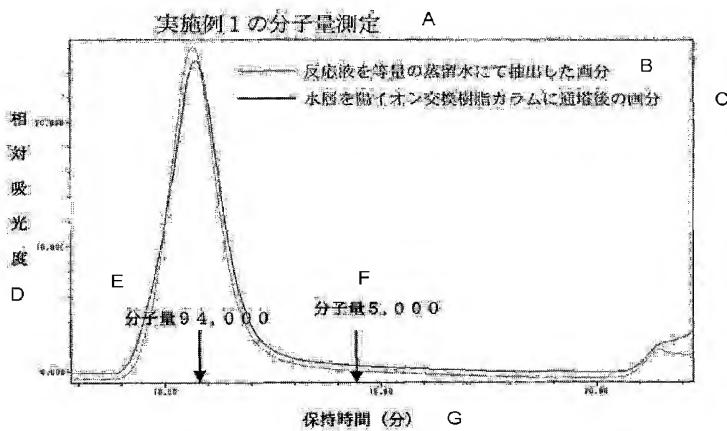
(10) 国際公開番号  
WO 2005/095494 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C08G 85/00,  
A61K 33/00, B82B 1/00, C01B 31/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006271
- (22) 国際出願日: 2005年3月31日 (31.03.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2004-102956 2004年3月31日 (31.03.2004) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 日本化薬株式会社 (NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1028172 東京都千代田区富士見一丁目11番2号 Tokyo (JP).
- (71) 出願人(および): 田畠 泰彦 (TABATA, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒6110024 京都府宇治市琵琶台3-8-16 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 山田 正敏 (YAMADA, Masatoshi) [JP/JP]; 〒6068203 京都府京都市左京区田中閑田町2-16-402 Kyoto (JP). 増田亮 (MASUDA, Akira) [JP/JP]; 〒3380001 埼玉県さいたま市中央区上落合6-10-21 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

/続葉有/

(54) Title: NOVEL WATER-SOLUBLE FULLERENE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND ACTIVE OXYGEN GENERATOR CONTAINING THE FULLERENE

(54) 発明の名称: 新規水溶性フラーレン、その製造方法およびそれを含む活性酸素発生剤



- A... MOL. WT. DETERMINATION IN EXAMPLE 1  
B... FRACTION OBTD. BY EXTRACTION OF REACTION MIXTURE WITH SAME AMT. OF DISTILLED WATER  
C... FRACTION OBTD. BY PASSING OF WATER LAYER THROUGH CATION EXCHANGE RESIN COLUMN  
D... REL. ABSORBANCE  
E... MOL. WT. 94,000  
F... MOL. WT. 5000  
G... RETENTION TIME (MIN)

(57) Abstract: A water-soluble fullerene wherein the number of water-soluble polymers bonded has been regulated can be obtained by coupling water-soluble polymers with a fullerene having functional groups in its molecule via the functional groups. This water-soluble fullerene can be used in the photodynamic therapy or supersonic therapy of cancer through the use thereof as an active oxygen generator.

/続葉有/

WO 2005/095494 A1



ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,

IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 分子中に官能基を有するフラーーゲンに水溶性高分子を該官能基を介して結合させることにより、水溶性高分子の結合数を制御した水溶性フラーーゲンを得ることができる。この水溶性フラーーゲンを活性酸素発生剤として使用することにより、癌の光線力学的治療あるいは超音波治療に適用できる。

## 明 細 書

### 新規水溶性フラーレン、その製造方法およびそれを含む活性酸素発生剤

#### 技術分野

[0001] 本発明は、新規水溶性フラーレン、その製造方法およびそれを含む活性酸素発生剤に関する。更に詳細には、分子中に官能基を有するフラーレンに水溶性高分子を該官能基を介して結合させて得られる新規水溶性フラーレン、その製造方法およびそれを含む活性酸素発生剤に関する。

#### 背景技術

[0002] 一重項酸素やスーパーオキシドアニオンなどの活性酸素は、フラーレン、ポルフィリン誘導体などの各種活性酸素発生剤に可視光等を照射することにより発生させることができる。この活性酸素は、反応性に富み、細胞のDNAを切断し、細胞増殖を抑制し、タンパク質分解酵素の活性を阻害するなどの細胞毒性を示すことから、例えば、癌、ウイルス感染症、細胞内寄生性感染症、肺線維症、肝硬変、慢性腎炎、動脈硬化、糖尿病性網膜症、老人性黄斑変性症及び血管狭窄病変などの各種疾患に対する効果が期待されている。

[0003] 活性酸素発生剤の一つであるフラーレンには、nの数に応じてC<sub>60</sub>、C<sub>70</sub>などの純炭素物質や金属もしくは金属酸化物を内包した炭素クラスターなどの化合物があることが知られている(非特許文献1)。フラーレン自体は、水不溶性であるため、生体内への投与が困難である。一方、癌組織には、正常組織と比べてその組織構造の違いから、高分子物質が移行しやすく、また癌組織に長く滞留する傾向がある(非特許文献2)。これらの理由により、水溶性を付与するとともに、癌組織に特異的に移行し、滞留する特性を付与し、正常組織が活性酸素による細胞毒性を被ることに起因する副作用を軽減するために、各種水溶性高分子をフラーレンと結合させることが検討されている。このような水溶性高分子としては、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、デキストラン、プルラン、デンプン、及びこれらの高分子の誘導体を用いることが提案されている(非特許文献3、特許文献1)。

また、フラーレンに結合する置換基の結合数が、活性酸素の生成量に大きく影響することも知られている(非特許文献4)。

[0004] 癌組織に集積した光増感剤は光照射によって反応性に富んだ一重項酸素等を生成し、その周辺の癌組織のみを選択的に破壊する。このように、光増感剤と光照射とを組み合わせた癌治療を光線力学的治療という。この光線力学的治療用光増感剤として、片末端にメチル基を有し他端にアミノ基を有する複数のポリエチレングリコールを直接結合させたフラーレンが知られている(特許文献1)。

[0005] さらに、液体に超音波を照射すると、液体内部に泡が生成(cavitation)し、この生成した泡が壊れる際に、局所的に熱や圧力などが発生する。これによりラジカル( $\cdot\text{OH}$ など)が発生し、このラジカルが励起状態から基底状態に遷移したり、再結合する際に、主として300～600nmの波長範囲を有する光を出す。この現象はソノルミネッセンスとして知られている(非特許文献5)。これを利用し、片末端にメチル基を有し他端にアミノ基を有する複数のポリエチレングリコールを直接結合させたフラーレンを含有する超音波治療用活性酸素発生剤が知られている(特許文献2)。

特許文献1:特開平9-235235号公報

特許文献2:特開2002-241307号公報

非特許文献1:化学、50(6), 1995

非特許文献2:松村ら, 癌と化学療法, Vol.14, No.3, p821-829, 1987

非特許文献3:BIO INDUSTRY, Vol.14, No.7, p30-37, 1997

非特許文献4:Toxicology in vitro, Vol.16, p41-46, 2002

非特許文献5:Science, Vol.247, p1439-1445, 1990

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0006] ポリエチレングリコール等の水溶性高分子を複数結合した上記のようなフラーレンが得られているが、その結合ポリエチレングリコールの数は一定ではない。即ち、水溶性高分子の結合数を制御することができず、従って、この結合数に依存する活性酸素の生成量にバラつきが生じ、医療用としての使用を考えた場合、製品の規格化が難しい。

本発明は、水溶性高分子の結合数を制御した水溶性フラーレン、即ち、修飾分子数が制御された高分子結合水溶性フラーレンの提供を目的とする。更には、そのような水溶性フラーレンの製造方法、それを含む活性酸素発生剤を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明は、分子中に官能基を有するフラーレンに水溶性高分子を該官能基を介して結合させた水溶性フラーレンに関する。

更に本発明は、分子中に官能基を有するフラーレンの官能基に水溶性高分子を反応させることを特徴とする水溶性フラーレンの製造方法に関する。

更に本発明は、上記水溶性フラーレンまたは上記製造方法により製造される水溶性フラーレンを含有する活性酸素発生剤に関する。

### 発明の効果

[0008] 本発明によれば、水溶性高分子の結合数を制御した水溶性フラーレンを得ることができる。本発明の水溶性フラーレンに光を照射すると、220nm～可視光領域(380～780nm)の広い波長範囲で $O_2^-$ (スーパーオキシドアニオン)等が発生する。特に、260～450nmの波長範囲で高い $O_2^-$ 発生能を發揮することにより癌の光線力学的治療に適用できる。また、超音波照射により惹起されるソノルミネッセンスによって発生する光は、主として300～600nmの波長範囲を有するので、これにより本発明の水溶性フラーレンは $O_2^-$ を発生する。本発明の水溶性フラーレンは超音波治療にも好適である。

### 図面の簡単な説明

[0009] [図1]実施例1で得られたPEG1分子結合フラーレンを高速液体クロマトグラフィーに付して分子量を測定した結果を示す。

[図2]特開平9-235235号公報の実施例1に記載された方法に従って合成したフラーレン-水溶性高分子結合体を高速液体クロマトグラフィーに付して分子量を測定した結果を示す。

[図3]実施例1および2で得られた本発明の水溶性フラーレンの粒子径を光散乱法により測定した結果を示す。

[図4]実施例2で得られた本発明の水溶性フラーレンの光照射による活性酸素発生量を測定した結果を示す。

[図5]実施例2で得られた本発明の水溶性フラーレンの光照射によるin vitro癌細胞増殖阻害活性を測定した結果を示す。

[図6]実施例1で得られた本発明の水溶性フラーレンの光照射によるin vivo抗癌活性を測定した結果を示す。

[図7]実施例2で得られた本発明の水溶性フラーレンの超音波照射による活性酸素発生量を測定した結果を示す。

[図8]実施例1で得られた本発明の水溶性フラーレンの超音波照射によるin vitro癌細胞増殖阻害活性を測定した結果を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明の水溶性フラーレンは、分子中に官能基を有するフラーレンに水溶性高分子を該官能基を介して結合させたことを特徴とする。

本発明で使用するフラーレンは、その種類が特に限定されるものではなく、活性酸素を発生するものであればいかなる種類のものも使用し得る。具体的には、炭素原子数が60の純炭素物質C<sub>60</sub>フラーレン、C<sub>70</sub>フラーレン、純炭素物質であるナノチューブフラーレン、各種高次フラーレンなどを用いることができる。これらの各種フラーレンは、市販されており、例えば本荘ケミカル(株)、三菱商事(株)、東京化成工業(株)などから入手することができる(商品名:C<sub>60</sub>フラーレン、C<sub>70</sub>フラーレン、マルチウォールナノチューブ、シングルウォールナノチューブなど)。なかでも供給および取り扱いの容易さの点から、C<sub>60</sub>フラーレンを用いるのが好ましい。

[0011] フラーレンに結合している官能基としては、例えばカルボキシル基、アミノ基、水酸基、シアノ基、チオール基等が挙げられる。その結合数は、1—5個が好ましく、1個がより好ましい。特に好ましくは、分子中に1つのカルボキシル基を有するフラーレンである。この分子中に1つのカルボキシル基を有するフラーレンは、市販されており、例えば(株)サイエンスラボラトリーズ等の試薬会社から入手することができる。また、文献「テトラヘドロン レターズ 1995年36巻38号6843頁」記載の方法にて合成することができる。

- [0012] 本発明で使用する水溶性高分子は、特に限定されるものではないが、分子量が1,000～1,000,000のもの、好ましくは4,000～50,000のものを用いることができる。
- [0013] 本発明で使用する水溶性高分子としては特に限定されるものではなく、市販されている各種水溶性高分子を使用することができる。なかでも、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンのような非イオン性水溶性合成高分子；デキストラン；プルラン；デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、ヒドロキシプロピルデンプンのようなイオン性もしくは非イオン性多糖類；これらの修飾物；これらの水溶性高分子の2成分もしくは3成分の共重合体もしくは複合体；ヒアルロン酸；キトサン；キチン誘導体などを用いることができる。なかでもフラーレンと共通の溶媒を持ち、フラーレンとの結合反応に関与する官能基が分子末端のみにあり、化学結合様式が単純であるなどの理由から、ポリエチレングリコールを好ましく用いることができる。特に4,000～15,000のポリエチレングリコールを用いるのが好ましい。
- [0014] 本発明で使用する水溶性高分子は、通常、フラーレンの官能基と反応する反応性基を有するものが用いられる。反応性基としては、例えばカルボキシル基、アミノ基、水酸基、シアノ基、チオール基等が挙げられる。なかでもアミノ基、水酸基などの脱水縮合反応性を有する反応性基が好ましく、より好ましくはアミノ基である。なお、反応性基がC1～C6アルキル基を介して水溶性高分子と結合していくてもよい。このような反応性基は、フラーレンとの結合に適した位置であれば水溶性高分子の分子内のいかなる位置に存在してもよいが、結合のしやすさを考慮して、水溶性高分子の末端に位置するのが好ましい。このような反応性基を有しない水溶性高分子を用いる場合には、フラーレンとの結合の前にまず反応性基を導入しておくことが必要である。
- [0015] 本発明で使用する水溶性高分子は、片末端に不活性基を有し他端に反応性基を有するものが好ましい。不活性基としては、例えばC1～C6アルキル基、C1～C6アルコキシ基、ベンジル基、その他通常保護基として使用されるものが挙げられる。水溶性高分子としてポリエチレングリコールを用いる場合、C1～C6アルキル基が好ましい。C1～C6アルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、n-プロピル基、イ

ソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基等が挙げられ、入手の容易性からメチル基が好ましい。

- [0016] 本発明で使用する水溶性高分子としては、片末端に不活性基を有し他端に反応性基を有する分子量4000～15000のポリエチレングリコールが好ましく、特に片末端にC1～C6アルキル基を有し他端にアミノ基を有する分子量4000～15000のポリエチレングリコールが好ましい。また、片末端に不活性基を有する分子量4000～15000のポリエチレングリコールと、フラーレンの官能基と反応する反応基を有する化合物との複合体も好ましく、特に片末端にC1～C6アルキル基を有し他端にアミノ基を有する分子量4000～15000のポリエチレングリコールと、アスパラギン酸などのアミノ酸との反応物が好ましい。
- [0017] 本発明の水溶性フラーレンは、生体への投与が可能な程度の水溶性を有していればよい。水溶性高分子と結合したフラーレンは、凝集体を形成するものが好ましく、その凝集体の粒径は、癌などの組織への移行と集積のし易さおよび正常細胞への移行を考慮すると、光散乱法による測定において20～400nm程度が好ましく、より好ましくは30～200nm程度である。このような凝集体を形成するために必要な水溶性高分子の分子量は、用いる水溶性高分子の種類およびフラーレンに結合する数によっても異なる。例えば1分子当たり1個のアミノ基を有するポリエチレングリコールの場合には分子量が2,000～30,000、好ましくは4,000～15,000の範囲であるのが好ましい。
- [0018] 本発明の水溶性フラーレンの製造方法は、分子中に官能基を有するフラーレンの官能基に水溶性高分子を反応させることを特徴とする。分子中に官能基を有するフラーレンを使用することにより、水溶性高分子の結合数を制御することが可能となる。例えば、分子中に1つの官能基を有するフラーレンを使用すると水溶性高分子を1つ有するフラーレンが得られ、分子中に2つの官能基を有するフラーレンを使用すると水溶性高分子を2つ有するフラーレンが得られる。例えば、分子中に1つのカルボキシル基を有するフラーレンと片末端にC1～C6アルキル基を有し他端に反応性基を有する水溶性高分子を縮合反応させる場合、分子中に1つのカルボキシル基を有するフラーレンと片末端にC1～C6アルキル基を有し他端に反応性基を有する水溶性

高分子の使用割合は前者1モルに対して後者0.1～10モル程度、好ましくは前者0.5モルに対して後者2モル程度であり、より好ましくは前者1モルに対して後者1～1.1モル程度である。

[0019] 反応は、例えば縮合反応、付加反応、置換反応等の公知の化学結合を生成させる反応が挙げられる。縮合反応の場合は、例えば、水溶性高分子の反応性基がアミノ基の場合、通常のペプチド縮合反応によって行われる。ペプチド縮合反応の場合、フラーレンに結合する官能基はカルボキシル基であり、脱水縮合剤の存在下に行われる。当該脱水縮合剤としては、ジシクロヘキシカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、1-ジメチルアミノプロピル-3-エチルカルボジイミドなどのカルボジイミド、ベンゾトリアゾール-1-イルートリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロフェスフェートなどのホスホニウム塩、ジフェニルホスホリルアジドなどが挙げられ、好ましくは、ジイソプロピルカルボジイミドである。脱水縮合剤の使用量は、フラーレンのカルボキシル基に対して0.5～10モル当量であり、好ましくは、1～2モル当量である。反応は、添加剤存在下または非存在下で行われ、添加剤としては、N-ヒドロキシスクシンイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、4-ニトロフェノール、ペンタフルオロフェノールなどが挙げられ、好ましくは、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールである。添加剤の使用量は、フラーレンのカルボキシル基に対して0.5～10モル当量であり、好ましくは、1～2モル当量である。

[0020] この反応では有機溶媒を使用する。有機溶媒としては、反応が進行する限り特に限定されないが、例えば、ベンゼン、トルエン、キシレンなどの芳香族炭化水素類、塩化メチレン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、クロロベンゼン、ブロモベンゼン、1,2-ジクロロベンゼンなどのハロゲン化炭化水素類；ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジメトキシエタン、ジエチレングリコルジメチルエーテルなどのエーテル類；アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類；ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ヘキサメチルリン酸トリアミドなどのアミド類；N,N-ジメチルイミダゾリジノンなどのウレア類；これら溶媒の混合溶媒などが挙げられ、好ましくは、トルエン、クロロベンゼン、ブロモベンゼン、1,2-ジクロロベンゼン及びジオキサンとジクロロメタンの1:1混合溶媒であり、より好ましくは、ブロモベ

ンゼンである。反応温度は、−20～100°C、好ましくは0～50°C、より好ましくは室温～37°Cであり、反応時間は、1～72時間、好ましくは3～24時間である。本反応は遮光下で行うのが好ましい。得られた反応生成物は、自体公知の分離手段、例えば、減圧濃縮、溶媒抽出、結晶化、クロマトグラフィー、透析、凍結乾燥などにより単離、精製することができる。

- [0021] 水溶性高分子としては特に限定されるものではなく、上述したような市販されている各種水溶性高分子を使用することができる。なお上述したように、水溶性高分子は、フラーレンとの結合を可能とするように、通常アミノ基などの反応性基を有しているものを用いる。反応性基を有しない水溶性高分子を用いる場合には、フラーレンとの結合の前にまず反応性基を導入することが必要である。例えばカルボキシル基を有する水溶性高分子においては、N-ヒドロキシスクシンイミドとカルボジイミド、カルボジイミドまたはクロロ炭酸エチルなどを用いるカルボキシル基とアミノ化合物との結合反応によりアミノ基を高分子鎖に導入する。例えば、ポリエチレングリコールにアミノ基を導入するには、片末端カルボキシル基を有するポリエチレングリコールをpH5.0のリン酸緩衝液(10重量%)に溶解し、そこへ水溶性カルボジイミドをカルボキシル基に対して3倍モル量投入し、室温で1時間攪拌することによりカルボキシル基を活性化する。その後、エチレンジアミンをカルボキシル基に対して10倍モル量加え、更に室温で6時間反応させる。得られた反応液を水に対して透析することにより片末端にアミノ基が導入されたポリエチレングリコールを得ることができる。また、片末端がアミノプロピル基で、他端がメチル基であるポリエチレングリコール、即ち、 $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3\text{NH}_2$ (nは90～300程度の整数を示す)は、日本油脂株式会社から入手可能である。
- [0022] また、前述のように、水溶性高分子が片末端に不活性基を有するポリエチレングリコールとフラーレンの官能基と反応する反応基を有する化合物との複合体であってもよく、フラーレンの官能基と反応する反応基を有する化合物としてはアミノ酸が挙げられ、好ましくはアスパラギン酸やグルタミン酸等の酸性アミノ酸が挙げられる。該複合体は、例えば以下のようにして製造される。アミノ基を保護した酸性アミノ酸と片末端がC1-C6アルキル基で他端がアミノ基で置換されたC1-C6アルキル基のポリエチレ

ングリコールとを有機溶媒中、脱水縮合剤存在下で反応させる。反応条件は前述の水溶性高分子の反応基がアミノ基であり、フラーレンの官能基がカルボキシル基である場合のペプチド縮合反応の際と同様の条件でよい。得られた反応物を保護基に応じた脱保護反応に付すことにより片末端C1—C6アルキル基のポリエチレングリコールが結合したアミノ酸誘導体である水溶性高分子を得ることができる。具体的には、後述の実施例3に示す。

[0023] 本発明の活性酸素発生剤は、上記のようにして得られた水溶性高分子と結合した水溶性フラーレンを含有し、水溶液や含水溶媒の溶液として使用される。この水溶性フラーレンに光を照射すると、220～可視光領域(380～780nm)の広い波長範囲で $O_2^-$ が発生する。特に、260～450nmの波長範囲で高い $O_2^-$ 発生能を発揮する。従って、光照射による癌の光線力学的治療に適用できる。また、超音波照射により惹起されたソノルミネッセンスによって発生する光は、主として300～600nmの波長範囲を有するので、本発明の活性酸素発生剤は超音波治療にも好適である。

本発明の活性酸素発生剤により発生する活性酸素には、一重項酸素( $^1O_2$ )、スーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )、過酸化水素( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル( $\cdot OH$ )等が含まれる。

[0024] 本発明の水溶性フラーレンは、水系溶媒中では、一定の大きさの凝集体を形成する。水系溶媒としては、例えば水、水ーアセトニトリル等が挙げられる。本発明の活性酸素発生剤は、フラーレンが水溶性高分子と結合しているため、生体に投与するのに十分な水溶性を有すると共に、一定の大きさの凝集体を形成するので、癌組織や炎症組織への高い移行性、滞留性を有すると考えられる。この凝集体は、結合する水溶性高分子の数がそろったフラーレンの凝集体で、高分子ミセル構造をとると考えられる。

[0025] 本発明の活性酸素発生剤に含まれるフラーレンは、超音波照射により惹起されたソノルミネッセンスによって発生する光により、水性媒体中で一重項酸素やスーパーオキシドアニオンなどの活性酸素を発生させることにより細胞毒性を示すため、後述するような癌を含む各種疾患の治療に使用することができる。照射する超音波としては、周波数約100KHz～20MHz、特に約1～3MHzのものを好ましく使用することが

できる。照射は、約0.1～5Watt/cm<sup>2</sup>、なかでも約2Watt/cm<sup>2</sup>の出力で行うのが好ましい。照射時間は、用いる周波数、照射出力によっても異なるが、約5～300秒、好ましくは約30～120秒であり、パルス照射の場合、その Duty cycle は、約1～100%、好ましくは約10%である。

[0026] 本発明の活性酸素発生剤は、活性酸素が細胞毒性を示すあらゆる種類の癌、ウイルス感染症、細胞内寄生性感染症、肺線維症、肝硬変、慢性腎炎、動脈硬化、糖尿病性網膜症、老人性黄斑変性症及び血管狭窄病変などの治療に有効である。例えば癌としては、肺癌、肝癌、胰癌、胃腸癌、膀胱癌、腎癌、脳腫瘍のような臓器の表層およびその内部に発生するあらゆる固形癌を挙げることができる。なかでも、本発明の活性酸素発生剤を超音波治療に使用する場合には、光照射が不可能であり従来は光線力学的治療が不可能であった身体深部の癌の治療に有効に用いることができる。その他の疾病については、その病巣または感染細胞もしくは罹患細胞が臓器内部に位置しているので、活性酸素発生剤をその部位に適当な方法によって集積させた後、そこに外部より光もしくは超音波照射することによって治療を行うことができる。

[0027] 本発明の活性酸素発生剤は、注射剤、分散剤、流動性剤、固体粉末剤などのあらゆる剤型とすることができます。例えば注射剤とする場合には、本発明の活性酸素発生剤を、注射剤に一般に用いられる緩衝剤、生理食塩水、保存剤、注射用蒸留水などの各種添加剤を配合して注射剤とすることができる。本発明の活性酸素発生剤は静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、皮内などに投与することができ、その投与量は、投与経路、患者の年齢、性別、疾患の種類及び状態によっても異なるが、成人1日当たり、本発明の水溶性フラーレンとして約1～10mg/kgを1～数回に分けて投与することができる。

[0028] 上述したように、癌組織や炎症組織には、正常組織と比較して高分子物質が移行しやすく、かつ蓄積しやすい。したがって、水溶性高分子と結合したフラーレンを含有する本発明の活性酸素発生剤は、生体に投与されると、正常組織に比べて癌組織や炎症組織に蓄積され、正常組織におけるよりも高濃度で長く癌組織や炎症組織に滞留する。一方、正常組織においては癌組織や炎症組織におけるよりも速やかに

本発明の活性酸素発生剤が排泄されるため、本活性酸素発生剤を生体に投与後、ある程度の時間をおけば、癌組織や炎症組織における本活性酸素発生剤の濃度は、正常組織における濃度よりも有意に高いものとなり、本活性酸素発生剤が癌組織や炎症組織に特異的に高濃度で分布することになる。したがって、本活性酸素発生剤を生体に投与後、ある程度の時間をおいた後に生体に光もしくは超音波を照射すれば、光もしくは超音波照射により惹起されたソノルミネッセンスによって発生する光により活性酸素発生剤が一重項酸素などの活性酸素を発生することにより癌組織や炎症組織において特異的に抗癌活性や抗炎症活性が示す。一方、正常組織においては、本活性酸素発生剤の濃度は低くなっているため、正常組織に対する細胞毒性は癌組織や炎症組織におけるほど高くなく、正常組織における副作用が軽減されることが期待される。

[0029] ヒトにおいて本発明の活性酸素発生剤の投与後、癌組織や炎症組織での活性酸素発生剤の濃度が正常組織での濃度よりも有意に高くなり、光もしくは超音波照射が可能になるまでの時間は、個々の患者の治療部位における代謝の状態、活性酸素発生剤の分布の時間変化などによって異なるが、一般的には投与の約0.1～48時間後、特に約24時間後に光もしくは超音波照射を行うのが好ましい。超音波をヒトに照射する場合には、前述したような周波数を、前述したような出力、時間で照射する。したがって、本発明の活性酸素発生剤を用いて治療を行なうには、本発明の活性酸素発生剤を、例えば注射剤の剤型で患者に投与し、約0.1～48時間後に、光照射装置もしくは超音波発生装置を用いて照射を行なう。投与量、及び投与／照射の頻度、回数などは、患者の年齢、体重、性別、疾患の種類及び状態などに応じて決定することができる。

[0030] 本発明の活性酸素発生剤は、癌組織や炎症組織に特異的に移行、蓄積されるわけではないが、目標とする組織や細胞へ本発明の活性酸素発生剤を送達する任意の方法、例えばドラッグデリバリーシステムにより特異的に送達する方法を用いることにより、目標とする組織や細胞でその細胞毒性作用を示させることが可能である。このような方法としては、目標とする組織や細胞に本発明の活性酸素発生剤を直接注入する方法(例えば内視鏡を用いることで体内のほとんどの部位への送達が可能で

ある)、目標とする組織や細胞に対する抗体、レクチン、細胞接着因子、糖鎖などの細胞認識因子を活性酸素発生剤に結合させた本発明の活性酸素発生剤を投与する方法などを挙げることができる。また、本発明の活性酸素発生剤を生体に投与後、活性酸素発生剤に活性酸素を発生させたい部位のみに光もしくは超音波照射することにより、所望の箇所でのみ活性酸素を発生させて細胞毒性を示させることもできる。また、光もしくは超音波をフォーカシングすることによって、細胞毒性発現部位の選択性を向上させることも可能である。

[0031] 以下に、実施例、参考例および試験例を示し、本発明を更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

#### 参考例1

##### (1, 2-メタノ[60]フラーレン)-61-カルボン酸の合成

テトラヘドロン レターズ、1995年、36巻、38号、6843頁に記載の方法により得られる(1, 2-メタノ[60]フラーレン)-61-カルボン酸tert-ブチルエステル(540mg, 0. 65mmol)をトルエン(380mL)に溶解し、4-トルエンスルホン酸1水和物(222mg, 1. 17mmol)を加えて、10時間加熱還流した。析出した褐色沈殿物をろ取り、トルエン、蒸留水およびエタノールにて順次洗浄後、減圧下乾燥して、(1, 2-メタノ[60]フラーレン)-61-カルボン酸(338mg, 収率67%)を褐色結晶として得た。

[0032] FAB-MS (positive mode) : m/z 779 (M+H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>/DMSO-d<sub>6</sub> (1:1), ppm) : 5. 15 (<sup>1</sup>H, s).

#### [0033] 実施例1

##### PEG(分子量5000)1分子結合フラーレンの合成

0. 33mM(1, 2-メタノ[60]フラーレン)-61-カルボン酸のプロモベンゼン溶液14. 7mLに等モル量の片末端メチル基で他端アミノプロピル基のポリエチレングリコール(PEG, 分子量5000, 日本油脂製)を含むプロモベンゼン溶液2mLを加え、2倍モル量の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール及びN, N'-ジイソプロピルカルボジイミドを添加し、室温、24時間、遮光条件下で攪拌した。反応液を等量の蒸留水にて抽出した。水層を陽イオン交換樹脂カラム(SP-トヨパール650M, H<sup>+</sup>型)に通塔後、溶出液を凍結乾燥し、PEG(分子量5000)1分子結合フラーレン(24. 4mg)を得た。

薄層クロマトグラフィー(展開溶媒:20%メタノール-ジクロロメタン)相対移動度(Rf)  
:0. 75.

[0034] 実施例2

PEG(分子量12000)1分子結合フラーレンの合成

分子量5000の代わりに分子量12000の片末端メチル基で他端アミノプロピル基のPEG(日本油脂製)を用い、実施例1と同様の操作をすることにより、PEG(分子量12000)1分子結合フラーレン(47. 4mg)を得た。

薄層クロマトグラフィー(展開溶媒:20%メタノール-ジクロロメタン)相対移動度(Rf)  
:0. 73.

[0035] 試験例1

実施例1で合成したPEG(分子量5000)1分子結合フラーレンの分子量の分析

実施例1において反応液を等量の蒸留水にて抽出した画分と、水層を陽イオン交換樹脂カラムに通塔後の画分を用いて分子量の測定をTSKgel G3000PW<sub>XL</sub>(東ソー株式会社)を接続した高速液体クロマトグラフィーシステム8020(東ソー株式会社)を用いて実施した。移動相として20%アセトニトリル及び0. 3M塩化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝液、pH6. 9を用い、移動相の流速を0. 5mL/minとし、検出はフラーレンの紫外部吸収で行った。その結果を図1に示す。分子量マーカーとしては、分子量が既知のポリエチレングリコール(分子量94, 000及び5, 000)を用い、その保持時間を図1中に示した。

[0036] 比較対照として、特開平9-235235号公報の実施例1に記載された方法に従って、分子量5000の片末端メチル基で他端アミノプロピル基のPEGを用い、フラーレンとPEGのモル比が1:10の比率で合成したフラーレン-水溶性高分子結合体の分子量の測定を実施した。移動相として0. 3M塩化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝液、pH6. 9を用い、移動相の流速を1mL/minとし、検出はフラーレンの紫外部吸収で行った。その結果を図2に示す。分子量マーカーとしては、分子量が既知のポリエチレングリコール(分子量94, 000、46, 000及び5, 000)を用い、その保持時間を図2中に示した。

[0037] これらの結果から、分子量約5, 800の実施例1の化合物は自己組織化によって分

子量約100,000の凝集体を形成し、そのサイズが大きくなっていることが示された。またその凝集体は、溶液組成が異なる状態においても再現良く形成され、結合する水溶性高分子の数が一定でそろっているために分子量分布の狭い、単一なピークを示した。一方、特開平9-235235号公報の実施例1に従って合成したフラーレンー水溶性高分子結合体は、主に分子量46,000以下に主要成分を有するが、その分子量分布が幅広く、複数のピークが見られたことから、水溶性高分子の結合数の制御により均一な凝集体が得られることが示された。

[0038] フラーゲンに結合する置換基の結合数が、活性酸素の生成量に大きく影響することが知られており(文献: Toxicology in vitro, Vol.16, p41-46, 2002)、実施例1の化合物のように1置換の誘導体であることはドラッグデリバリーシステムのターゲッティング及び活性酸素の生成量の点からも、従来のフラーレンー水溶性高分子結合体と比較して有用である。

[0039] 試験例2

#### 実施例1で合成したPEG(分子量5000)1分子結合フラーレンの粒径の測定

本発明の水溶性フラーレンについて、光散乱法による粒径測定を行った。実施例1で合成した水溶性フラーレンを蒸留水に最終濃度1mg/mL及び100μg/mLになるように溶解した。この溶液を光散乱測定装置DLS-7000(大塚電子株式会社)で測定した。その測定結果を図3に示す。

測定結果より、実施例1の化合物は比較的粒径がそろった約50nmの粒子径を、実施例2の化合物は若干粒径分布が広い約100nmの粒子径を、それぞれ有する凝集体であることが示された。これらの粒子径は、高分子物質が、正常組織に比べてがん組織に移行しやすく、またがん組織に長く滞留する傾向があるというEPR効果(Enhanced Permeation and Retention effect)を示すのに充分な大きさであると考えられる。

[0040] 試験例3

#### 実施例2で合成したPEG(分子量12000)1分子結合フラーレンの活性酸素発生量の測定

チトクローム法により、活性酸素(スーパーオキシドアニオン, O<sub>2</sub><sup>-</sup>)発生量を測定し

た。最終濃度50 μMになるようにチトクロムc(ナカライトスク社)をハンクス平衡塩溶液(HBSS, pH 7.4、ライフテックオリエンタル社)に溶解した溶液200 μLと、実施例2で調製したPEG(分子量12000)1分子結合フラーレンを最終濃度200 μMになるようにHBSSに溶解した溶液200 μLを混合した。この混合溶液に種々の波長の光(220～800nm)を分光蛍光光度計F-2000(日立製作所)を用いて、30°Cで20分間照射した。照射後、溶液の550nmの吸光度を分光光度計DU-650(ベックマン社)で測定した。30°Cで20分間遮光条件下の溶液をコントロールとし、1分間当たりのO<sub>2</sub><sup>-</sup>発生量を図4に示した。

[0041] 実施例2の水溶性フラーレンは光の照射を行った場合、紫外～可視光領域の広い波長範囲でO<sub>2</sub><sup>-</sup>が発生が観察され、特に260～450nmの広い波長範囲で有意な発生が認められた。従って、光照射による癌の光線力学的治療に適用できる事が示された。また、超音波照射により惹起されたソノルミネッセンスによって発生する光は、主として300～600nmの波長範囲を有するので、本化合物は超音波治療にも好適である事が示された。

[0042] 実施例3

PEG(分子量5000)2分子がL-アスパラギン酸のカルボキシル基にアミド結合した水溶性高分子がフラーレンに結合した水溶性フラーレンの合成

実施例1と同様の操作をすることにより片末端メチル基で他端アミノプロピル基のPEG(分子量5000)2分子がL-アスパラギン酸の2つのカルボキシル基にアミド結合した水溶性高分子がフラーレンのカルボキシル基に結合した水溶性フラーレンを得た。

50mM Boc-L-アスパラギン酸(和光純薬製)のN, N-ジメチルホルムアミド溶液5mLに3倍モル量の片末端メチル基、他端アミノプロピル基のポリエチレングリコール(PEG, 分子量5000, 日本油脂製)を含むN, N-ジメチルホルムアミド溶液10mLを加え、3倍モル量の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール及びN, N'-ジイソプロピルカルボジイミドを添加し、室温、24時間、遮光条件下で攪拌した。反応液にジイソプロピルエーテルを添加し、沈殿物を得た。沈殿物を蒸留水に溶解後、陰イオン交換樹脂カラム(DEAE-トヨパール650M, Cl<sup>-</sup>型)および陽イオン交換樹脂カラム(SP

ートヨパール650M, H<sup>+</sup>型)に通塔後、溶出液を凍結乾燥し、カルボキシル基にPEG(分子量5000)2分子がアミド結合したBoc-L-アスパラギン酸を得た。得られた化合物1gを5mLのトリフルオロ酢酸に溶解し、室温、1時間で脱保護を行った。反応液にジイソプロピルエーテルを添加し、沈殿物を減圧乾固することで、カルボキシル基にPEG(分子量5000)2分子がアミド結合したL-アスパラギン酸を得た。

実施例1における分子量5000の片末端メチル基、他端アミノプロピル基のポリエチレングリコールの代わりに、カルボキシル基にPEG(分子量5000)2分子がアミド結合したL-アスパラギン酸を用い、実施例1と同様の操作をすることによりPEG(分子量5000)2分子結合フラーレンを得た。

#### [0043] 試験例4

##### 実施例2の水溶性フラーレンに光照射した場合の癌細胞増殖阻害活性の測定

光照射によるin vitroでの癌細胞増殖阻害活性を測定した。癌細胞としてRLmale 1細胞(京都パストール研究所より供与)を用い、この細胞を100mmディッシュにてRPMI1640培地(シグマ社、ウシ胎児血清10%含有)中、5%CO<sub>2</sub>、95%大気、37°Cの培養条件下で、80%コンフルエントになるまで培養した。実施例2の水溶性フラーレンを遮光条件下で、癌細胞の培養に用いたものと同じ組成の培地に溶解し、250 μMの濃度に調整後、滅菌濾過を行った。滅菌調整した250 μMの溶液を培地にて順次希釈し、125 μM、および62.5 μMの溶液を調製した。96ウエルプレートの各ウエルに調製した種々の溶液を10 μLずつ分注し、コントロールのウエルには実施例2の化合物を含まない培地のみを10 μL分注した。上記の80%コンフルエントになった細胞を5×10<sup>4</sup>細胞/mLに調製して細胞懸濁液を得、上記の各ウエルに細胞懸濁液を100 μLずつ分注した。96ウエルプレートをシェーカーにて軽く攪拌した後、8Wライトボックス(富士カラー販売)上に20分、または40分間放置し、光照射を行った。光照射後、プレートをアルミホイルで遮光し、インキュベータ(37°C、5%CO<sub>2</sub>)内で3日間培養した。光未照射のコントロールは攪拌後、直ちにプレートをアルミホイルで遮光し、3日間培養した。3日間培養後各ウエルに生細胞数測定試薬SF(ナカライトスク社)を10 μLずつ添加し、インキュベータで80分間保温した後、450nmの吸光度をマイクロプレートリーダーVERSAmax(日本モレキュラーデバイス社)

で測定した。各光照射時間について、実施例2の化合物未添加における450nmの吸光度を生存率100%として癌細胞の生存率を求め、結果を図5に示した。

実施例2の水溶性フラーレンは40分間の光照射において、その添加量の増加に従って癌細胞の生存率が顕著に低下することが示された。

[0044] 試験例5

実施例1の水溶性フラーレンに光照射した場合の抗癌活性の測定

光照射におけるin vivoの抗癌活性を投与経路を変えて比較した。担癌マウスは、マウス結腸癌Colon26細胞(癌研究会 癌化学療法センターより供与)をBALB/c-nn(雌、日本チャールズ・リバー社)皮下移植にて継代した腫瘍塊を摘出し、細切片をCDF1マウス(雌、日本チャールズ・リバー社)の背部皮下に移植することによって作製した。移植5日後に皮下に直径5mm程度の腫瘍を形成したマウスを担癌マウスとして実験に用いた。実施例1の化合物を6mg/mLになるようにリン酸緩衝生理食塩液に溶解し、腫瘍部皮下または腫瘍内に100μL投与した群には、投与5分後にbluephase(ビバデント社)を用いて腫瘍部位に光照射を行った。照射条件は直径8mmのプローブを用いて650W/cm<sup>2</sup>の出力で4分間照射した。この操作を3日間連続して行った。静脈内投与群は、実施例1の水溶性フラーレンを60mg/mLになるようにリン酸緩衝生理食塩液に溶解し、マウス尾静脈内に100μL投与し、投与24時間後にbluephaseを用いて腫瘍部位に光照射を行った。照射条件は皮下および腫瘍内投与群と同一条件であり、この操作を3日間連続して行った。

水溶性フラーレン未投与で光照射を行わない担癌マウスを対照群とし、経時的に各マウス皮下の腫瘍サイズを計測した。腫瘍サイズは腫瘍の長軸と短軸をノギスにて実測し、Winnにより報告されている計算式(Natl. Cancer Inst. Monogr., Vol. 2, p113-138 (1960))を用いて算出した。その結果を図6に示した。

[0045] 実施例1の水溶性フラーレンの投与と光照射を併用すると腫瘍体積の増加は抑制され、その抑制効果は皮下投与<腫瘍内投与<静脈内投与の順で増加した。静脈内投与群は24時間後の光照射にもかかわらず最も効果的であったことから、本発明の水溶性フラーレンは、経血管的に投与することが至適投与方法であり、EPR効果が寄与している可能性が示された。

## [0046] 試験例6

実施例2の水溶性フラーレンに超音波照射した場合の癌細胞増殖阻害活性の測定

受田の報告(DOJIN NEWS, No. 96, p1–6, 2000)を参考に生細胞数測定試薬SFを用いて、超音波照射による活性酸素(スーパーオキサイドアニオン,  $O_2^-$ )の発生量を測定した。実施例2の水溶性フラーレンを $200\ \mu M$ になるようにハンクス平衡塩溶液に溶解した溶液を35mmディッシュに $750\ \mu L$ ずつ分注した。これに $600\ \mu L$ のハンクス平衡塩溶液と $150\ \mu L$ の生細胞数測定試薬SFを混合し、攪拌しながら、液面より種々の出力の超音波(1. 5, 2. 0, 2. 5, および $3.0\text{W/cm}^2$ )を超音波治療器US-700(伊藤超短波社)を用いて、周波数1MHz、出力モード(Duty cycle)30%で5分間照射した。照射後、溶液の450nmの吸光度を分光光度計DU-650で測定した。化合物を添加せずに超音波照射を行った溶液の450nmの吸光度をコントロールとし、1分間当たりの $O_2^-$ 発生量を求め図7に示した。

実施例2の水溶性フラーレンは超音波照射を行った場合、その出力増加に従って活性酸素の発生量が増加することが示された。

## [0047] 試験例7

実施例1の水溶性フラーレンに超音波照射した場合の癌細胞増殖阻害活性の測定

超音波照射におけるin vitroの抗癌活性を測定した。試験例4と同様にRLmale1細胞を用いた。実施例1の水溶性フラーレンを遮光条件下で、癌細胞の培養に用いたものと同じ組成の培地に溶解し、 $500\ \mu M$ の濃度に調整後、滅菌濾過を行った。滅菌調整した $500\ \mu M$ の溶液から、 $250\ \mu M$ の溶液を調製した。6ウエルプレートに調製した溶液を $200\ \mu L$ ずつ分注し、コントロールのウエルには実施例1の水溶性フラーレンを含まない培地のみを $200\ \mu L$ 分注した。RLmale1細胞を $1\times 10^5$ 細胞/ $mL$ に調製して細胞懸濁液を得、上記の各ウエルに細胞懸濁液を $2mL$ ずつ分注した。ウエルの細胞をピペットで軽く混合した後、伝導ジェルを介してプレートの底部より、周波数1MHz、または3MHzの超音波を超音波治療器US-700を用いて、出力 $2.0\text{W/cm}^2$ 、出力モード20%で2分間照射した。超音波照射後、プレートをアルミホ

イルで遮光し、インキュベータ(37°C、5%CO<sub>2</sub>)内で3日間培養した。超音波未照射のコントロールは混合後、直ちにプレートをアルミホイルで遮光し、同様に3日間培養した。3日間培養後各ウエルから細胞懸濁液100 μLを96ウエルプレートに分注し、各ウエルに生細胞数測定試薬SFを10 μLずつ添加し、インキュベータで45分間保温した後、450nmの吸光度をマイクロプレートリーダーVERSAmaxで測定した。各周波数において実施例1の水溶性フラーレン未添加における450nmの吸光度を生存率100%として癌細胞の生存率を求め、結果を図8に示した。

[0048] 超音波照射においても試験例4と同様に本発明化合物の添加量の増加に伴い癌細胞の生存率が低下することが示された。この効果は周波数3MHzよりも1MHzのほうが顕著であった。従って本発明の水溶性フラーレンは、光照射による癌の光線力学的治療だけではなく、超音波照射による超音波治療にも使用できる事が示された。

### 産業上の利用可能性

[0049] 以上に詳細に説明したように、本発明によれば、水溶性高分子の結合数を制御した水溶性フラーレンを得ることができる。本発明の水溶性フラーレンに光を照射すると、220nm～可視光領域(380～780nm)の広い波長範囲でO<sub>2</sub><sup>-</sup>が発生する。特に、260～450nmの波長範囲で高いO<sub>2</sub><sup>-</sup>発生能を發揮する。また、超音波照射により惹起されたソノルミネッセンスによって発生する光は、主として300～600nmの波長範囲を有し、本発明の水溶性フラーレンに超音波を照射してもO<sub>2</sub><sup>-</sup>が発生する。更には、本発明の水溶性フラーレンは、癌組織や炎症組織に対して高い集積性を有する。従って、本発明の水溶性フラーレンを活性酸素発生剤として使用して、癌の光線力学的治療あるいは超音波治療に適用できる。

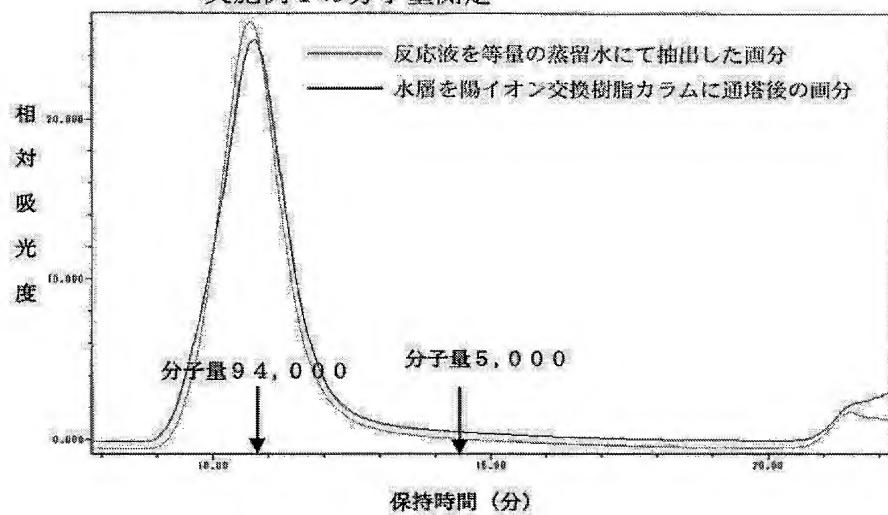
## 請求の範囲

- [1] 分子中に官能基を有するフラーレンに水溶性高分子を該官能基を介して結合させた水溶性フラーレン。
- [2] 官能基が1～5個である請求項1の水溶性フラーレン。
- [3] 官能基が1個である請求項1または2の水溶性フラーレン。
- [4] 官能基がカルボキシル基である請求項1から3のいずれかの水溶性フラーレン。
- [5] フラーレンがC<sub>60</sub>フラーレンである請求項1から4のいずれかの水溶性フラーレン。
- [6] 水溶性高分子の分子量が1,000～1,000,000である請求項1から5のいずれかの水溶性フラーレン。
- [7] 水溶性高分子が、非イオン性水溶性合成高分子、非イオン性もしくはイオン性多糖類、これらの修飾物、これらの水溶性高分子の2成分もしくは3成分の共重合体または複合体、ヒアルロン酸、キトサンおよびキチン誘導体から選択される水溶性高分子である請求項1から6のいずれかの水溶性フラーレン。
- [8] 水溶性高分子が、片末端に不活性基を有し他端にフラーレンの官能基と反応する反応基を有する水溶性高分子である請求項1から7のいずれかの水溶性フラーレン。
- [9] 水溶性高分子が、片末端に不活性基を有し他端にフラーレンの官能基と反応する反応基を有する分子量4000～15000のポリエチレングリコールである請求項8の水溶性フラーレン。
- [10] 水溶性高分子が、片末端にC1～C6アルキル基を有し他端にアミノ基で置換されたC1～6アルキル基を有する分子量4000～15000のポリエチレングリコールである請求項9の水溶性フラーレン。
- [11] 水溶性高分子が、片末端に不活性基を有する分子量4000～15000のポリエチレングリコールと、フラーレンの官能基と反応する反応基を有する化合物との複合体である請求項8の水溶性フラーレン。
- [12] 水溶性高分子が、片末端にC1～C6アルキル基を有し他端にアミノ基で置換されたC1～6アルキル基を有する分子量4000～15000のポリエチレングリコールと、アミノ酸との反応物である請求項11の水溶性フラーレン。

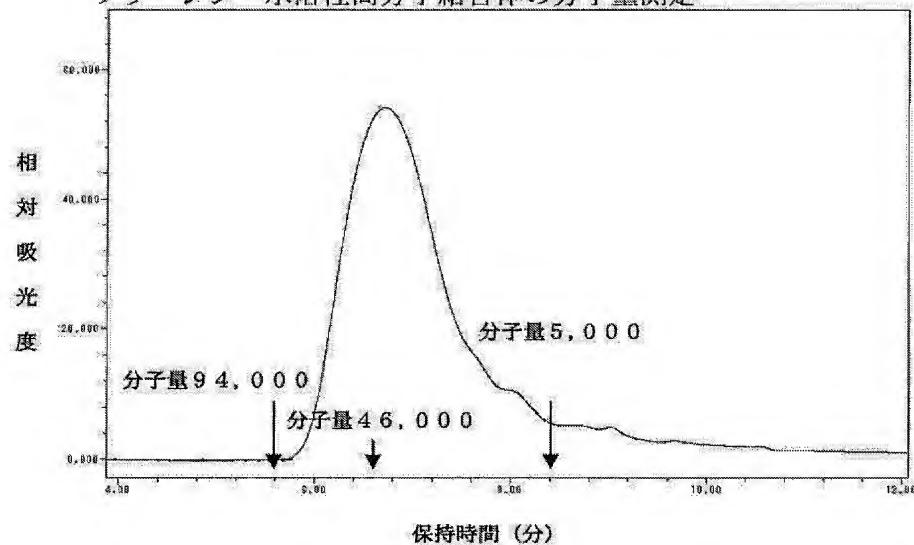
- [13] 水溶性フラーレンが凝集した凝集体の形態にある請求項1から12のいずれかの水溶性フラーレン。
- [14] 凝集体の大きさが20～400nmである請求項13の水溶性フラーレン。
- [15] 水溶性フラーレンもしくはその凝集体が水溶液の形態にある請求項1から14のいずれかの水溶性フラーレン。
- [16] 分子中に官能基を有するフラーレンの官能基に水溶性高分子を反応させることを特徴とする水溶性フラーレンの製造方法。
- [17] 水溶性高分子が、請求項6から12のいずれかの水溶性高分子である請求項16の水溶性フラーレンの製造方法。
- [18] フラーレンの官能基が1個のカルボキシル基である請求項16または17の水溶性フラーレンの製造方法。
- [19] 請求項1から15のいずれかの水溶性フラーレンまたは請求項16から18のいずれかの製造方法により製造される水溶性フラーレンを含有する活性酸素発生剤。
- [20] 光線力学的治療または超音波治療に用いるための請求項19の活性酸素発生剤。
- [21] 細胞の増殖を阻害するための請求項19の活性酸素発生剤。
- [22] 細胞が癌細胞である請求項21の活性酸素発生剤。
- [23] 癌の治療に用いるための請求項19から22のいずれかの活性酸素発生剤。

[図1]

## 実施例1の分子量測定

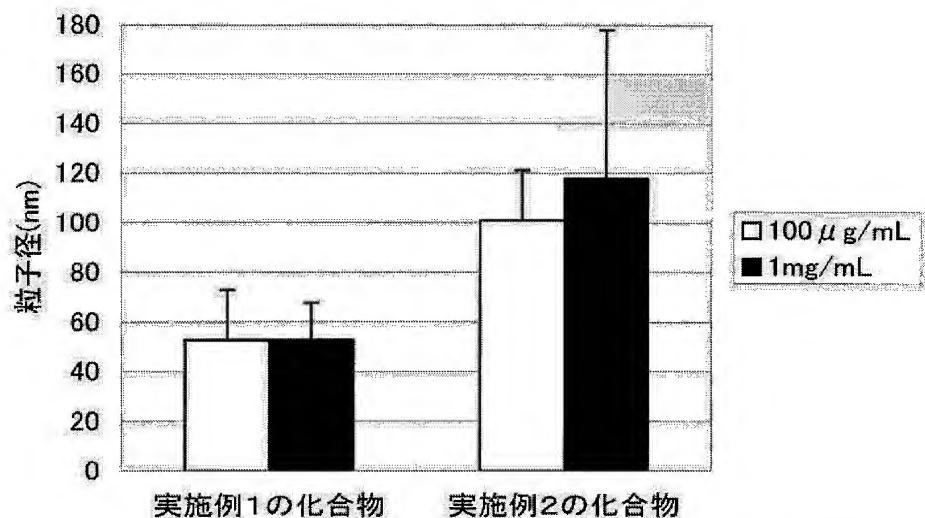


[図2]

特開平9-235235号の実施例1に従って、合成した  
フラーレン-水溶性高分子結合体の分子量測定

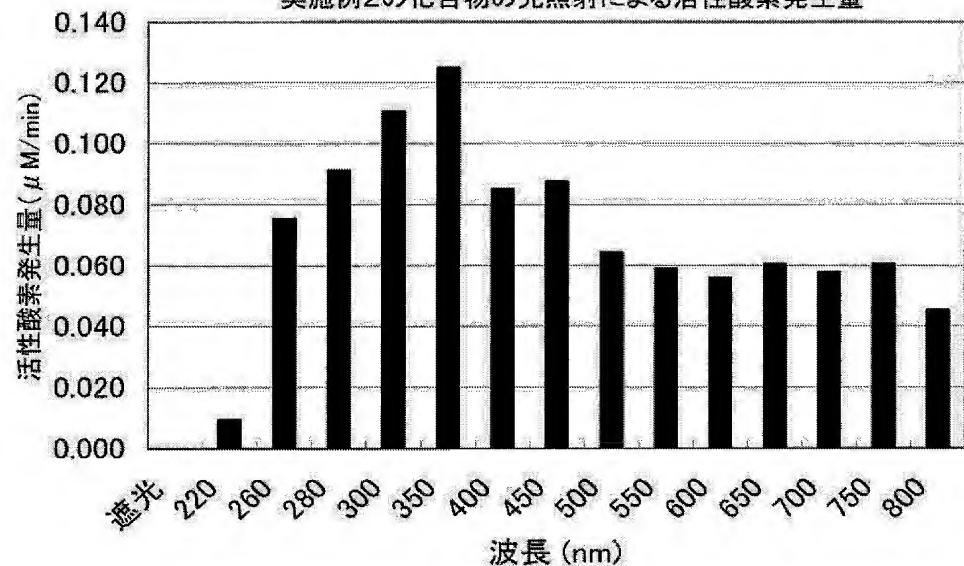
[図3]

## 実施例1及び2の化合物の粒子径



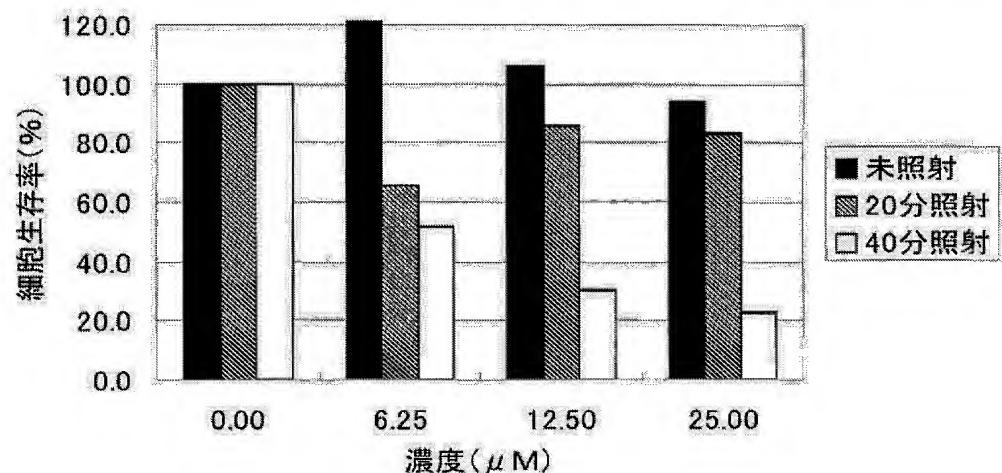
[図4]

## 実施例2の化合物の光照射による活性酸素発生量



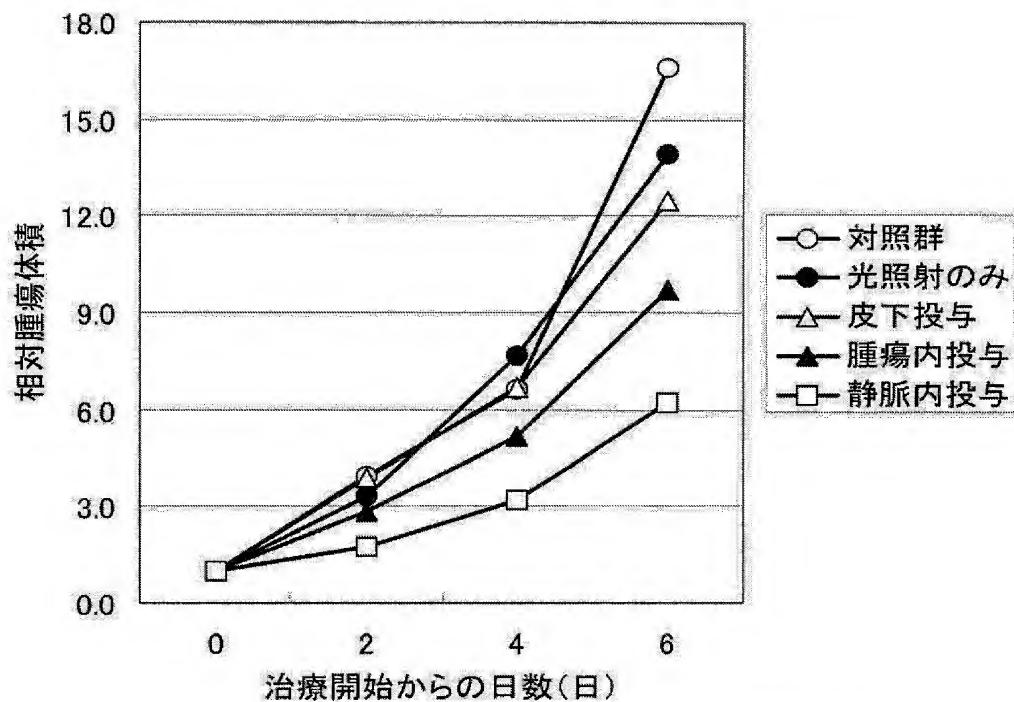
[図5]

## 実施例2の化合物の光照射によるin vitro癌細胞増殖阻害活性



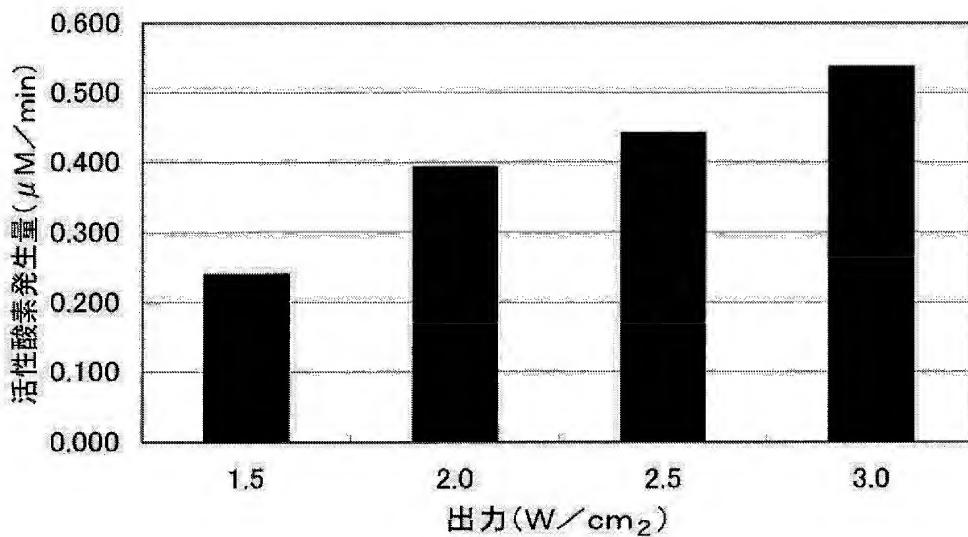
[図6]

実施例1の化合物の光照射によるin vivo抗癌活性



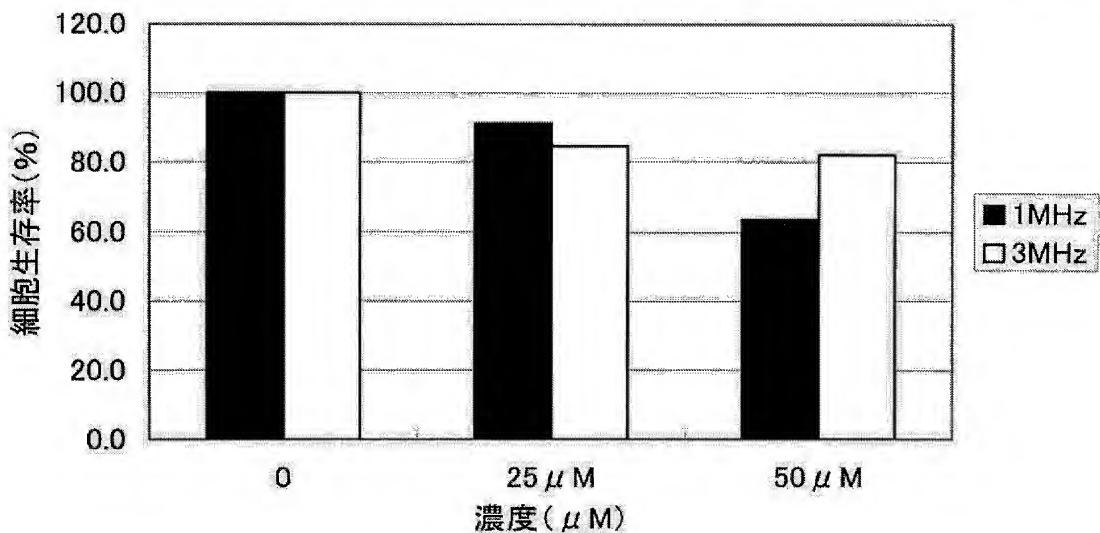
[図7]

実施例2の化合物の超音波照射による活性酸素発生量



[図8]

## 実施例1の化合物の超音波照射によるin vitro癌細胞増殖阻害活性



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006271

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C08G85/00, A61K33/00, B82B1/00, C01B31/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C08G85/00, A61K33/00, B82B1/00, C01B31/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 09-235235 A (Research Institute For Production Development), 09 September, 1997 (09.09.97), Claims; pages 3 to 4; Par. No. [0015] (Family: none)	1-23
Y	WO 2002/066061 A1 (Mitsubishi Corp.), 29 August, 2002 (29.08.02), Claims; page 5, line 8 to page 6, line 21 & EP 1362598 A1 Pages 3 to 4; Par. Nos. [0014] to [0016] & US 2004/0068207 A1 & JP 2002-241307 A	1-23

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&amp;” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 June, 2005 (06.06.05)Date of mailing of the international search report  
21 June, 2005 (21.06.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006271

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 09-136964 A (Long Y. Chiang), 27 May, 1997 (27.05.97), Claims & EP 770577 A1 & US 5648523 A & DE 69607437 E	1-23
Y	JP 2000-044215 A (Long Y. Chiang), 15 February, 2000 (15.02.00), Claims & EP 919520 A2 & US 6020523 A	1-23
Y	JP 2002-504525 A (Akushiba GMBH), 12 February, 2002 (12.02.02), Claims & US 6506928 B1 & WO 1999/043358 A1 & DE 19807979 A1 & EP 1056475 A1	1-23

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C08G85/00 A61K33/00 B82B1/00 C01B31/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C08G85/00 A61K33/00 B82B1/00 C01B31/02

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 09-235235 A (財団法人生産開発科学研究所) 1997. 09. 09, 特許請求の範囲, 第3-4頁【0015】(ファミリーなし)	1-23
Y	WO 2002/066061 A1 (三菱商事株式会社) 2002. 08. 29, 特許請求の範囲, 第5頁第8行-第6頁第21行&EP 1362598 A1, 第3-4頁【0014】-【0016】&US 2004/0068207 A1 & JP 2002-241307 A	1-23

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.06.2005

国際調査報告の発送日

21.06.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

4 J 9272

天野 宏樹

電話番号 03-3581-1101 内線 3457

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 09-136964 A (ロン ウイ チャン) 1997. 05. 27, 特許請求の範囲&EP 770577 A1&US 5648523 A &DE 69607437 E	1-23
Y	JP 2000-044215 A (ロング ウイ. チャン) 2000. 02. 15, 特許請求の範囲&EP 919520 A2&US 6020523 A	1-23
Y	JP 2002-504525 A (アクシーバ・ゲーエムベーハー) 2002. 02. 12, 特許請求の範囲&US 6506928 B1&WO 1999/043358 A1&DE 19807979 A1&EP 1056475 A1	1-23